

MODULATEURS DE DEVELOPPEMENT
DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES,
ET APPLICATIONS

5 L'invention concerne la culture des végétaux terrestres et celle des champignons mycorhiziens à arbuscules. Elle vise plus particulièrement les techniques utilisées pour stimuler la croissance et le développement des champignons mycorhiziens à arbuscules et/ou pour stimuler la mycorhization et le développement des plantes d'intérêt agronomique et/ou forestier.

10 Bon nombre de plantes terrestres, dès le stade juvénile, vivent en symbiose avec des micro-organismes qui leur sont associés au niveau des racines. Parmi ces micro-organismes, les champignons mycorhiziens à arbuscules (champignons MA), aussi désignés "champignons vésiculaires et arbusculaires" (champignons VAM), établissent avec certaines plantes, dites
15 plantes hôtes, une interaction intime assurant le fonctionnement mutualiste de la symbiose. L'établissement d'une telle symbiose entre une plante et les champignons mycorhiziens est appelé mycorhization.

Les champignons MA font parti d'un groupe de champignons archaïques, les Glomeromycota, dont les ancêtres seraient à
20 l'origine des groupes modernes Ascomycota et Basidiomycota (Schussler et *al.*, Mycological Research, 2001, 105:1413-1421).

Sûrement présents lors de l'apparition des premiers végétaux terrestres, les ancêtres des Glomeromycota auraient contribué à l'acclimatation des végétaux au milieu terrestre, assurant aux plantes un apport en
25 eau et en sels minéraux plus efficace. Par co-évolution (bio-radiations évolutives), les champignons MA auraient acquis au cours de l'évolution l'aptitude à interagir avec un nombre croissant de plantes, dites plantes hôtes. On estime actuellement que plus de 80 % des espèces végétales terrestres sont associées aux champignons mycorhiziens à arbuscules, parmi lesquelles, des
30 espèces herbacées d'intérêt économique majeur (aussi bien des espèces

BEST AVAILABLE COPY

céréalières, fruitières que potagères), mais aussi des espèces ligneuses (ornementales, forestières et fruitières).

Au niveau du champignon, cette interaction se manifeste par l'apparition de structures filamenteuses, appelées hyphes, qui se propagent en tout un réseau dans le sol. L'ensemble des hyphes du champignon forme le mycélium qui correspond à la structure assimilatrice du champignon.

Simultanément, le champignon se développe aussi dans les racines de la plante hôte. Il existe donc un continuum fongique entre le sol et les tissus racinaires. Grâce au réseau mycélien extraracinaire du champignon, la plante hôte dispose d'un plus grand volume d'exploration du sol pour s'approvisionner en eau et sels minéraux. Outre l'amélioration de l'apport hydrique et minéral dont profite la plante hôte, cette association symbiotique améliorerait également sa résistance aux pathologies racinaires.

Cette alliance fonctionnelle est également bénéfique pour les champignons MA qui ne peuvent vivre qu'en association avec des racines dont ils dépendent pour leur apport en substrats carbonés. Ainsi physiquement et fonctionnellement associés à la plante hôte, ces micro-organismes se multiplient dans le sol par dissémination de propagules (spores et/ou mycélium).

Depuis quelques années, on a tenté de mettre au point des techniques de symbiose dirigée permettant d'intensifier l'interaction bénéfique entre les champignons MA et de nombreuses espèces végétales cultivées, agricoles et forestières, de façon à améliorer l'apport hydrique et minéral de ces plantes hôtes, ainsi que leur résistance aux maladies racinaires. Ces techniques de symbiose dirigée ouvriront des perspectives prometteuses pour le développement de pratiques culturales plus respectueuses de l'environnement.

En particulier, l'épandage de champignons MA sur les sols de culture optimiserait leur teneur en ces micro-organismes bénéfiques pour la plante à cultiver, et permettrait par conséquent de réduire sensiblement les quantités d'engrais, notamment chimiques, ordinairement employés pour enrichir les sols, en particulier les phosphates et les nitrates qui contribuent en grande partie à la pollution des nappes phréatiques.

Toutefois, pour qu'un tel concept puisse s'appliquer aux grandes cultures, il faudrait pouvoir disposer d'une quantité importante de ces champignons MA, et de préférence sous forme de spores, plus faciles à manipuler et à stocker. Mais à l'heure actuelle, on ne connaît malheureusement
5 aucune méthode capable de produire des spores de champignons MA en quantité suffisante pour une telle application.

De nombreuses techniques ont pourtant été proposées pour améliorer le développement et la croissance des champignons MA, notamment pour amplifier leur sporulation. Généralement basées sur une co-culture du
10 champignon en présence d'une plante hôte entière en pot, ou *in vitro* en présence seulement de racines cultivées, ces techniques n'ont jusqu'à présent donné lieu qu'à des productions de propagules en quantités relativement faibles, insuffisantes pour une application agronomique à grande échelle.

La supplémentation du milieu de co-culture en exsudats racinaires, réputés être stimulateurs du développement des champignons MA, a
15 également été envisagée. (Bécard et *al.*, Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55:2320-25 ; Elias et *al.*, Appl. Environ. Microbiol., 1987, 53:1928-33). Malheureusement, à l'heure actuelle, on ne dispose d'aucune méthode d'obtention de ces stimulateurs autre que la récupération "passive" et lente des exsudats
20 produits et sécrétés progressivement par les racines des plantes. Egalement, les quantités ainsi recueillies sont tout juste suffisantes pour des expérimentations en laboratoire.

Du fait de la grande complexité de composition de ces exsudats, qui renferment des milliers de molécules allant des sucres simples, présents en grandes concentrations, aux molécules bien plus complexes,
25 présentes à l'état de traces (voir notamment Walker et *al.*, Plant Physiology, 2003, 132:44-51) et malgré les très nombreux travaux déjà menés sur ce sujet, le(s) facteur(s) réellement impliqué(s) dans la stimulation du développement et de la croissance des champignons MA, n'a(ont) toujours pas été identifié(s).

Dans ce contexte, l'invention vise à proposer de nouveaux facteurs de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA pour remédier à la très faible disponibilité de ces organismes.

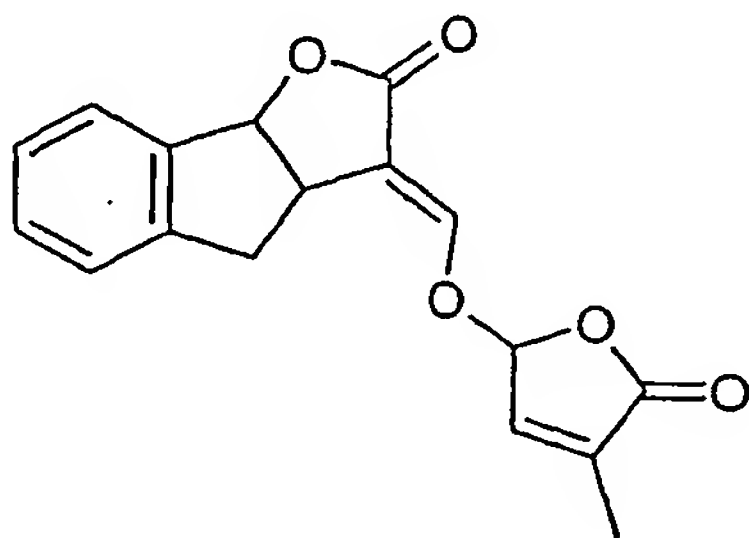
L'invention a également pour principal objectif de proposer de tels facteurs de stimulation dont la disponibilité et l'accessibilité de certains d'entre eux ne constituent pas une limite quant à leur application à grande échelle, c'est-à-dire une application qui va au-delà de celle des paillasses de laboratoire ou d'une simple culture sous-serre.

En particulier, l'invention a pour intérêt d'améliorer la productivité des méthodes d'obtention, notamment à l'échelle industrielle, d'inoculum de champignons MA.

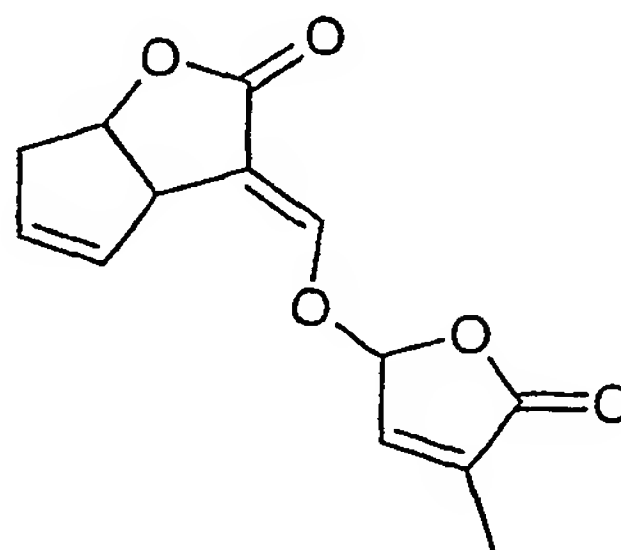
Dans tout le texte, par "inoculum", on entend toute forme de champignon MA susceptible de coloniser une plante hôte : spores, hyphes, vésicules, fragments de racines mycorhizées.

In fine, l'invention vise à améliorer les méthodes de mycorhization des plantes, notamment des plantes d'intérêt agronomique et/ou forestier, pour une culture intensive plus respectueuse de l'environnement.

Ainsi, l'invention concerne un procédé de traitement de champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, -notamment sous forme de spores- dans lequel on place au contact des champignons MA, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :

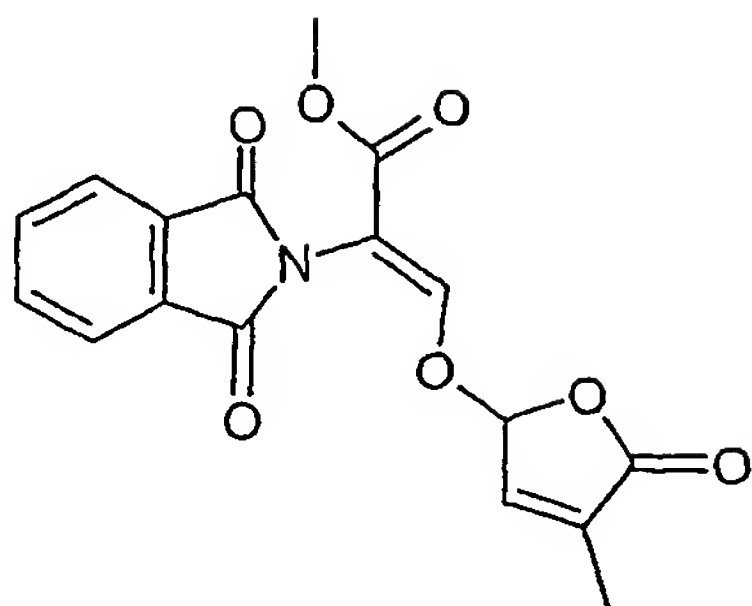


25 GR24 (Mangnus et *al.*,
J. Agric. Food Chem., 1992,
40(6):697-700)

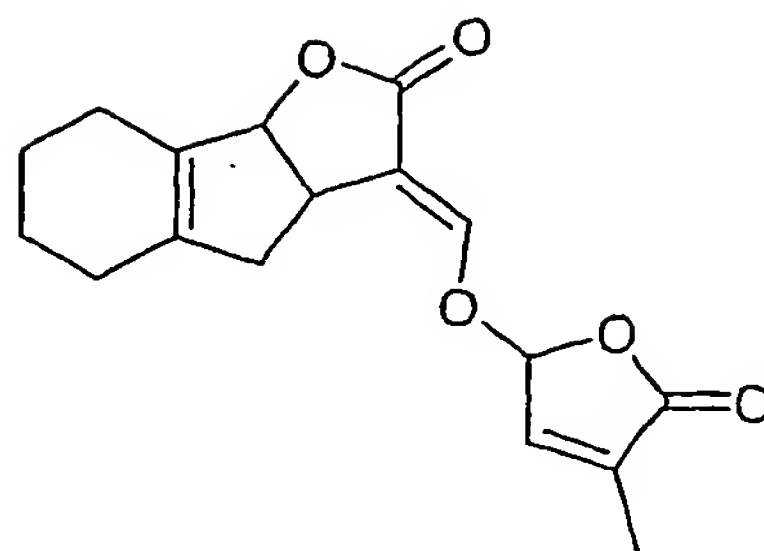


GR7 (Johnson et *al.*, Weed Res., 1976,
16:223-227)

5

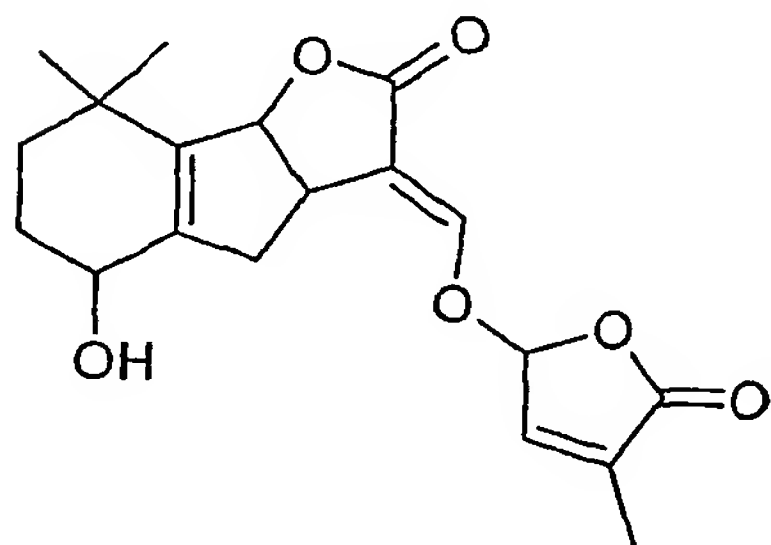


Nijmegen 1 (Nefkens et al.,
J. Agric. Food Chem., 1997,
45(6):2273-2277)

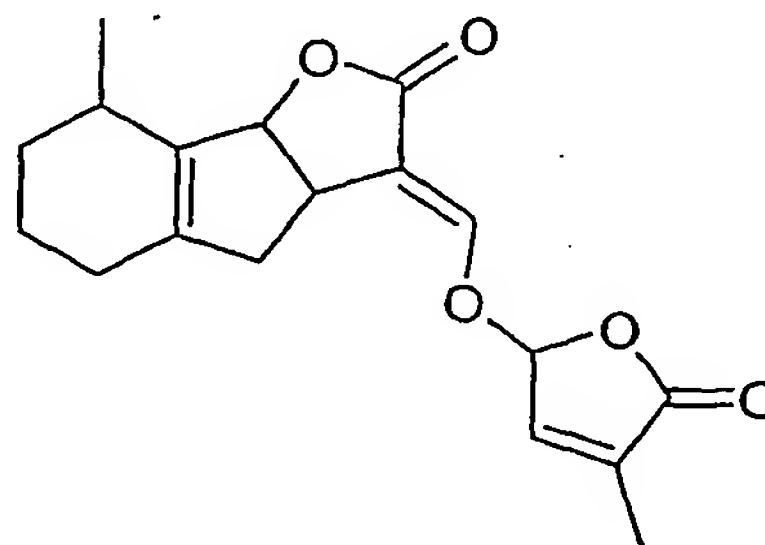


Déméthylsorgolactone (Thuring et al.,
J. Agric. Food Chem., 1997, 45(6):2278-
2283)

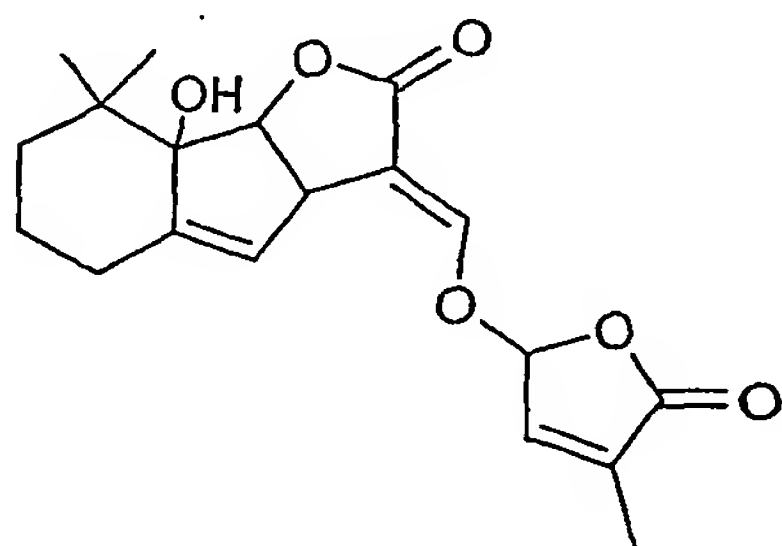
5



Strigol (Cook et al., Science, 1966,
1954:1189-1190 ;)

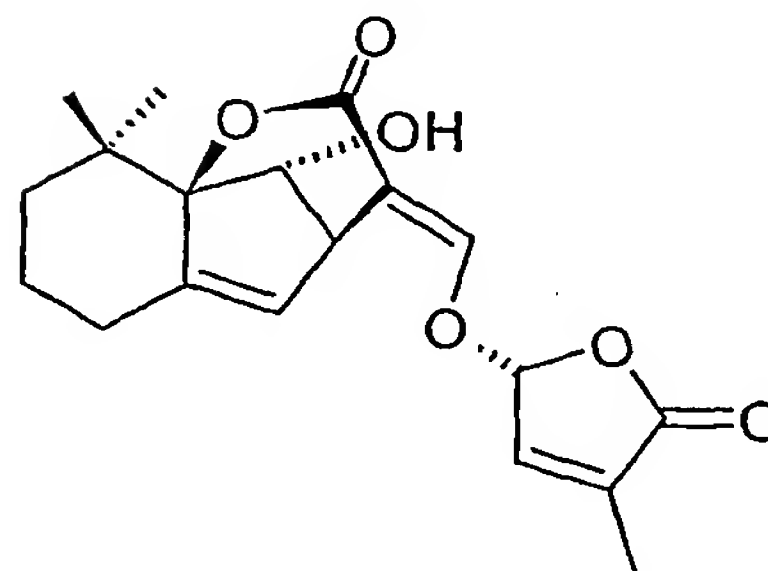


Sorgolactone (Hauck et al., J. Plant
Physiol., 1992, 139:474)



Alectrol

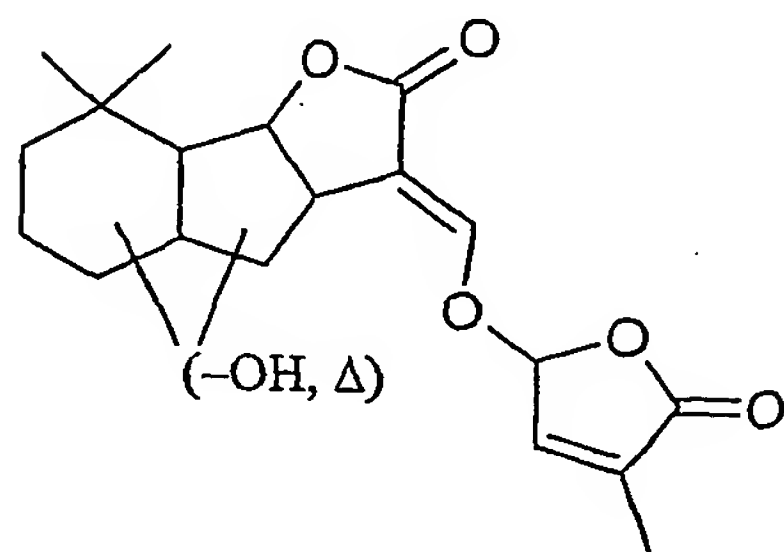
(Müller et al., J. Plant Physiol.,
1992, 11:77)



(Wigchert et al., J. Agric. Food Chem.,
1999, 47:1705-1710)

10

15



Orobanchol (Yokota et al.,
Phytochemistry, 1998, 49(7):1967-1973)

L'invention repose ainsi sur l'identification de composés de structure définie, ayant la capacité de stimuler la croissance et le développement des champignons mycorhiziens à arbuscules. En particulier, les travaux menés par les inventeurs ont effectivement révélé que des molécules déjà connues, GR7 et GR24, des analogues de synthèse de composés naturels appartenant à la famille des strigolactones, pouvaient avantageusement être utilisées à d'autres fins que l'élimination de plantes parasites.

En effet, les strigolactones (comme le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol), composés naturels extraits d'exsudats racinaires de différentes espèces végétales ont été initialement décrites comme des inducteurs de la germination des graines de plantes parasites des groupes *Striga* et *Orobanche* (Cook et al., Science, 1966, 154:1189-1190 ; Cook et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94:6198-6911) particulièrement néfastes pour certaines cultures d'intérêt économique majeur comme celles du sorgho, du maïs, de la canne à sucre, des fèves... Avec les strigolactones, la germination suicide, une nouvelle approche dans la lutte contre les plantes parasites a pu être envisagée.

Concrétisée avec l'émergence d'analogues de synthèse, comme GR7 et GR24, plus faciles à obtenir que les composés naturels et donc plus propices à une application à échelle industrielle, la germination suicide consiste en un traitement des sols agricoles, susceptibles d'être infestés de plantes parasites, par des analogues de synthèse de strigolactones et ce, au moment où la plante à cultiver ne pousse pas encore dans lesdits sols. En disséminant lesdits analogues de synthèse, on provoque la germination des graines dormantes des plantes parasites lesquelles, n'ayant pas de plante hôte à infester, finissent par mourir par manque de nutrition (Jonhson et al., Weed Research, 1976, 16:223-227).

Alors que GR7 et GR24 étaient jusqu'à présent consacrés spécifiquement et uniquement à la germination suicide des graines de plantes parasites appartenant aux groupes *Striga* et *Orobanche*, l'invention propose une exploitation, jusqu'alors impensable, de ces molécules pour leur effet biologique

inattendu sur les champignons MA, des micro-organismes de phylogénie très éloignée de celle des plantes *Striga et Orobanche*.

De manière jusqu'alors insoupçonnée, les inventeurs ont constaté que GR7 et GR24 entraînent une stimulation de la respiration cellulaire des spores des champignons MA et permettent d'amplifier le processus biologique de la ramification des hyphes de ces champignons. En traitant les spores par GR7 et/ou GR24, les inventeurs sont ainsi parvenus à stimuler la croissance et la ramification des champignons MA. Ces deux réponses physiologiques et morphologiques sont essentielles à l'établissement de l'interaction symbiotique entre les champignons MA et leurs plantes hôtes.

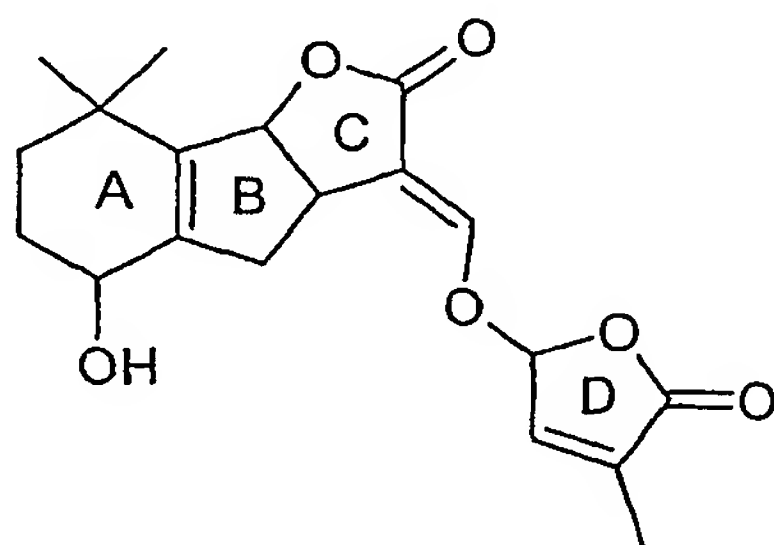
Ces travaux menés par les inventeurs permettent ainsi d'attester que l'effet de stimulation des exsudats racinaires sur le développement et la croissance des champignons MA, mis en évidence pour la première fois dans des travaux qui remontent au moins au début des années 80, provient au moins en partie des strigolactones, des composés qui, dans les exsudats racinaires, ne sont pourtant présents qu'en quantité infinitésimale. La sorgolactone (la strigolactone du sorgho), par exemple, a été isolée à partir d'exsudats racinaires recueillis à partir de 300 000 plants de sorgho, aboutissant à la purification de 5 µg de composés purifiés. Les quantités obtenues sont si faibles que la structure chimique de la sorgolactone n'a pu être définie qu'après synthèse chimique du composé et comparaison des spectres RMN. Pour la même raison, seules cinq strigolactones ont pu être caractérisées à l'heure actuelle.

L'invention repose ainsi sur le principe que des molécules de structure et de configuration particulières, notamment les molécules connues sous les appellations usuelles de GR7 et GR24, peuvent être utilisées à titre de facteurs de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA.

Le choix du facteur de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA pour la mise en oeuvre d'un procédé de traitement de champignons MA -notamment sous forme de spores- conforme à l'invention, ne se limite pas seulement à GR7 et GR24. Ce choix s'étend

également aux strigolactones en général et, en particulier, au strigol, à l'alectrol, à la sorgolactone et à l'orobanchol.

De même, et selon toute vraisemblance, l'effet recherché avec GR7 et GR24, mais également avec les strigolactones en général, sur les champignons MA vient de la structure et de la configuration particulières des cycles référencés B, C, et D de ces molécules, comme ci-après indiqués avec la molécule de strigol.



Aussi, les travaux des inventeurs montrent que tout composé de structure analogue à GR7, GR24 et aux strigolactones, c'est-à-dire tout composé reprenant la structure de l'enchaînement des cycles référencés B, C, et D des strigolactones (comme par exemple la déméthylsorgolactone) ou simplement leur configuration (comme par exemple le Nijmegen-1, un autre analogue de synthèse des strigolactones), peut être utilisé comme agent stimulateur du développement et/ou de la croissance des champignons MA, conformément à l'invention.

Avantageusement et selon l'invention, le traitement des champignons MA, ou inoculum de champignons MA, est réalisé de préférence sur des spores ou des fragments de racines mycorhizées.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise ledit traitement en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA.

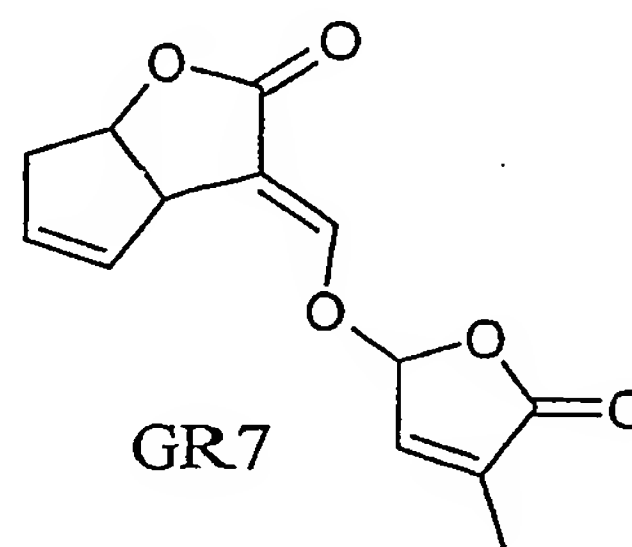
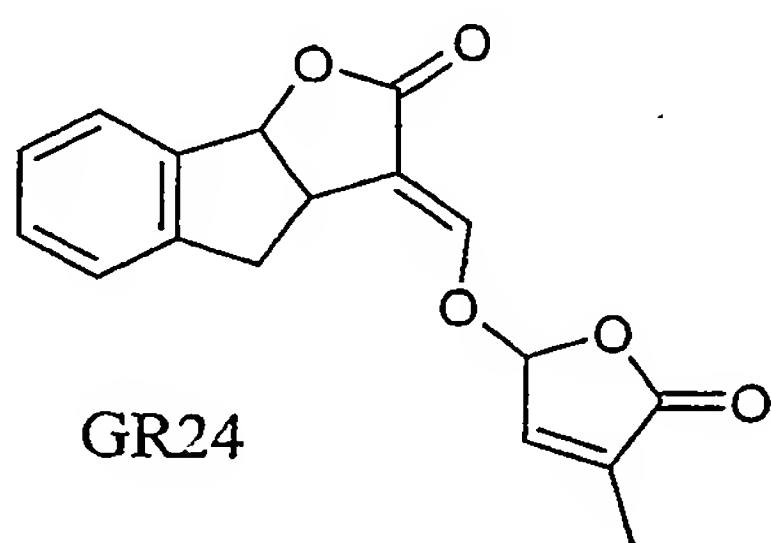
Selon un mode particulier de mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention, le traitement des champignons MA -notamment sous forme de spores ou de fragments de racines mycorhizées- est réalisé en milieu aseptique *in vitro*.

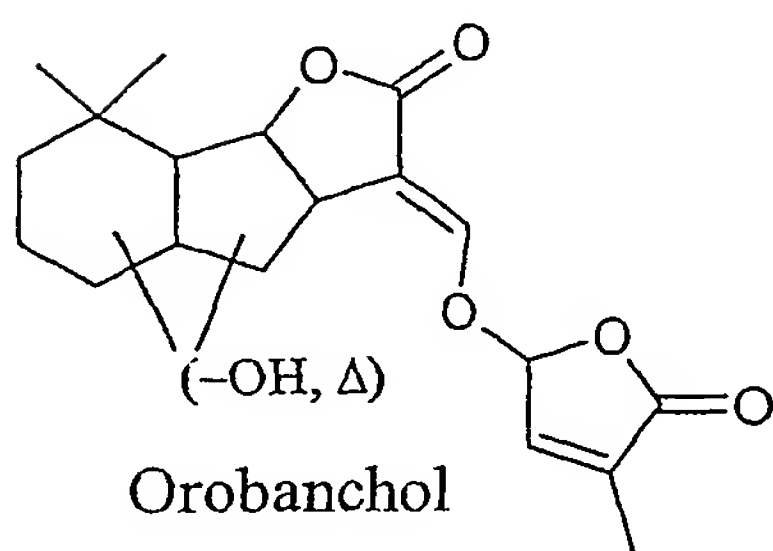
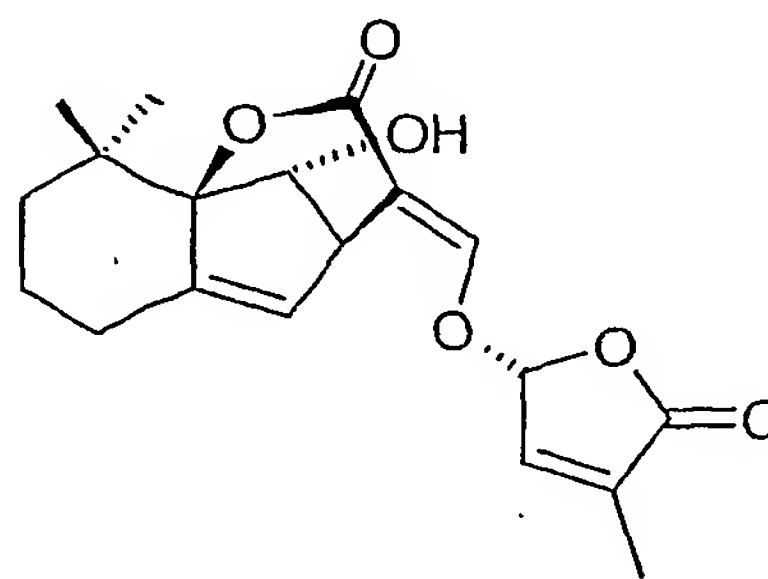
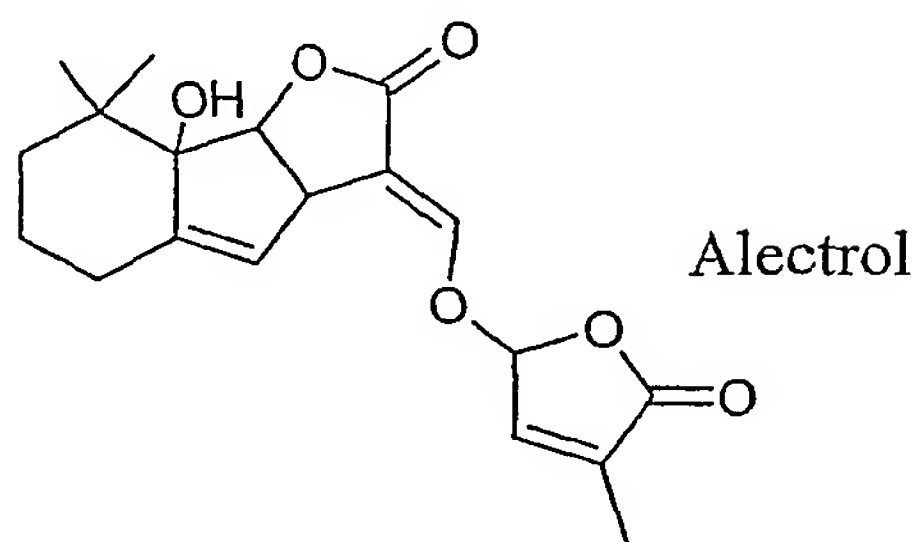
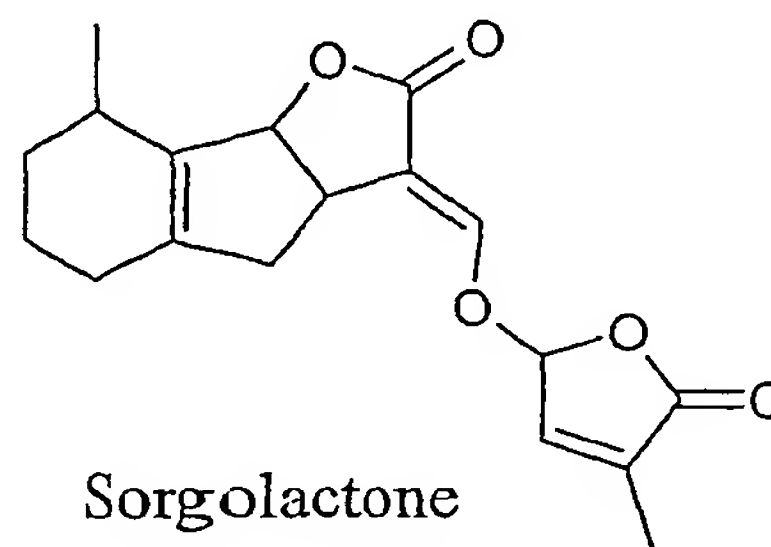
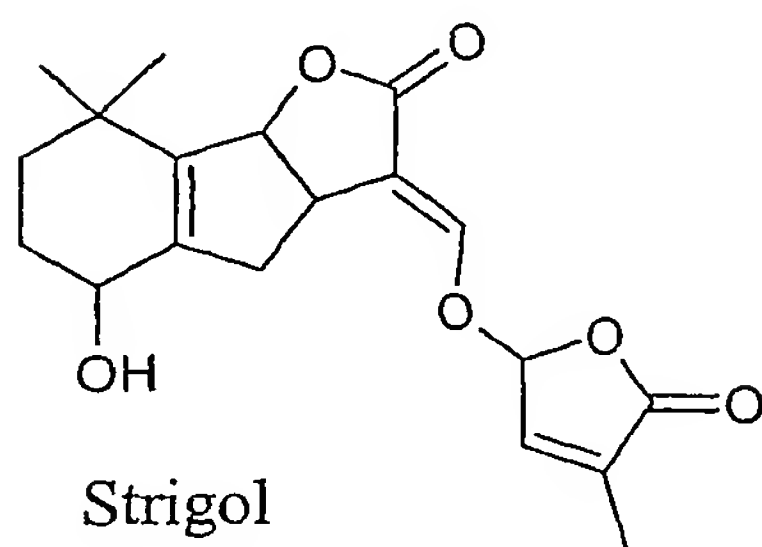
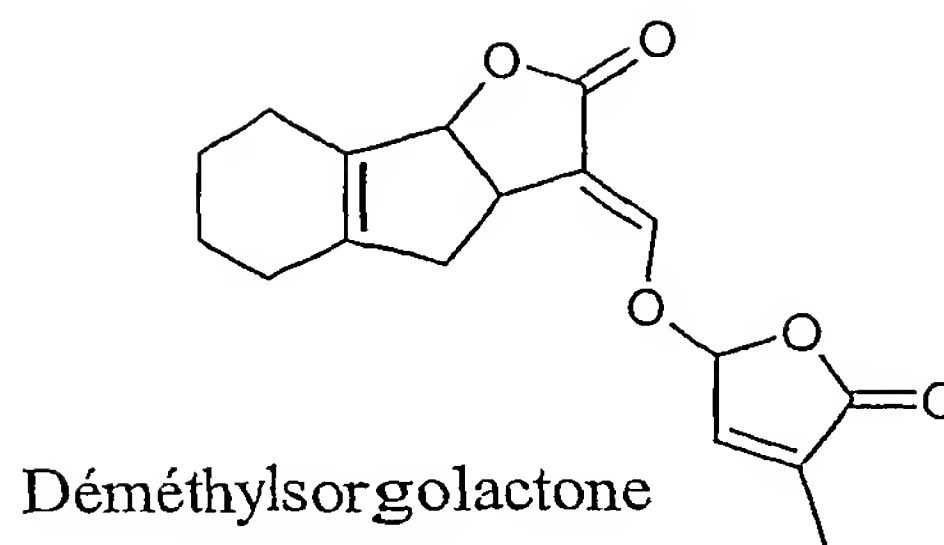
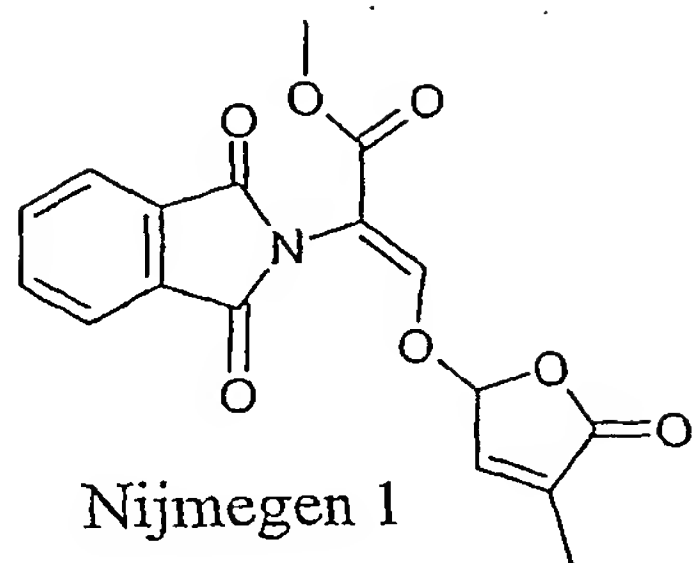
Selon un autre mode de mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention, le traitement est avantageusement réalisé sur des cultures de plantes hôtes entières cultivées en pot. Mais, on peut aussi envisager de mettre en oeuvre l'invention à plus grand échelle, notamment sur des plantes hôtes entières
5 cultivées en champ. On utilisera alors préférentiellement des composés de synthèse chimique, comme GR7 et GR24, qui présentent l'avantage, en comparaison avec les strigolactones, de pouvoir être disponibles en quantité suffisante et adaptée pour une application industrielle. Certains de ces composés, comme GR7 et GR24, sont déjà disponibles dans le commerce et/ou peuvent être
10 synthétisés selon des protocoles déjà connus (Mangnus et *al.*, J. Agric. Food Chem., 1992, 40(6):697-700 ; Mangnus et *al.*, J. Agric. Food Chem., 1992, 40(7):1230-1235 ; Thuring et *al.*, J. Agric. Food Chem., 1997, 45(6):2278-2283).

Avantageusement et selon l'invention, on utilise des champignons MA choisis parmi : *Glomus intraradices* et *Gigaspora rosea*.

15 L'invention s'étend aussi à un procédé pour produire de l'inoculum de champignons MA. A cet effet, on réalise une co-culture de champignons MA en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA.

20 Par ailleurs et selon l'invention, on place également au contact de ladite co-culture, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :





5

10

Avantageusement et selon l'invention, les champignons MA de ladite co-culture sont traités par un procédé de traitement de champignons MA -notamment sous forme de spores- conforme à au moins un des modes opératoires précédemment décrits.

15

De manière plus générale, l'invention peut avantageusement s'inscrire dans le cadre des problématiques de recherche visant à potentialiser la richesse minérale et hydrique naturelle des sols cultivables, essentiellement pour réduire l'usage habituel d'engrais chimiques, souvent sources de pollution par les phosphates et les nitrates.

L'invention, par la mise en évidence de facteurs dont certains sont déjà disponibles dans le commerce et capables de stimuler le développement et/ou la croissance des champignons MA, rend ainsi possible la mise en oeuvre, avantageusement à grande échelle, notamment à échelle industrielle, des techniques de mycorhization imaginées il y a plusieurs années mais dont l'application a été, jusqu'à présent, limitée par la faible disponibilité des spores et des autres formes d'inoculum de champignons MA, et par une méconnaissance de facteurs stimulant efficaces et facilement accessibles.

L'invention porte ainsi également sur un procédé de culture d'une plante hôte -en particulier, d'intérêt agronomique ou forestier- apte à former une symbiose avec des champignons MA. Pour ce faire, on réalise dans le milieu de culture un apport d'au moins un agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol et leurs analogues structuraux.

Selon l'invention, l'apport de l'agent de stimulation est réalisé lors du semis des graines de la plante hôte à cultiver et/ou ultérieurement audit semis.

Dans le cas de la transplantation en terre de jeunes plantes préalablement obtenues (par exemple, par bouturage, microbouturage, marcottage, multiplication *in vitro*,...), l'apport de l'agent de stimulation au milieu de culture (sol de culture) est réalisé lors de ladite transplantation.

Avantageusement et selon l'invention, la plante hôte est cultivée en champ. Elle peut également être cultivée sous serre.

Lorsque la plante hôte est cultivée en champ, il se peut très bien que le sol utilisé contienne naturellement des champignons MA en quantité suffisante. Il n'est alors pas nécessaire de supplémenter d'avantage le champ en ces micro-organismes. Toutefois, il peut s'avérer qu'une telle supplémentation soit nécessaire, sous forme de spores ou autre forme d'inoculum de champignons MA.

Avantageusement et selon l'invention, on supplémente le sol en inoculum de champignons MA, notamment lors du semis, et/ou on procède à un apport répété d'agents de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA -notamment jusqu'à la récolte-.

5 Avantageusement et selon l'invention, pour la mise en culture, on utilise des semences de la plante hôte, encapsulées avec les agents de stimulation précédemment évoqués, au moyen d'un enrobage en un matériau adapté pour permettre le développement de plantules de ladite plante hôte et la libération desdits agents de stimulation, essentiellement lors des premiers
10 arrosages.

L'invention s'étend à une composition comprenant en combinaison, une quantité de semence d'une plante hôte apte à former une symbiose avec des champignons MA, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24,
15 GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol et des analogues structuraux de ceux-ci.

Avantageusement et selon l'invention, ladite composition est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant, notamment l'eau.

20 Avantageusement, une composition selon l'invention comprend également une quantité de champignons MA, en particulier sous forme de spores -notamment de *Glomus intraradices* ou de *Gigaspora rosea*-.

L'invention porte également sur une composition comprenant en combinaison une quantité d'inoculum de champignons MA, en
25 particulier des spores, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol et des analogues structuraux de ceux-ci.

Avantageusement et selon l'invention, ladite composition
30 est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant, notamment l'eau.

L'invention concerne aussi un procédé de traitement de champignons MA, un procédé pour produire de l'inoculum de champignons MA, un procédé de culture d'une plante hôte ainsi qu'une composition, caractérisés en combinaison par tout ou partie des caractéristiques ci-dessus et ci-après.

5 D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention pourront également apparaître à la lecture de la description des analyses expérimentales suivantes.

Analyse 1 : Effet de GR24 sur l'activation de la respiration cellulaire de *Glomus intraradices*.

10 Des mesures polarographiques de la consommation d'oxygène ont été effectuées sur des spores de *Glomus intraradices* en germination, en présence ou non de GR24.

Pour ce faire, des spores de *Glomus intraradices* sont mises à germer dans du milieu minimum liquide, dit milieu M (le Tableau 1, ci-après, en présente la composition), pendant une semaine, à 30°C et dans une atmosphère enrichie à 2 % en CO₂. Par essai, on utilise 400 spores dans 1 ml de milieu M.

Pour la stimulation des spores, on ajoute à chaque essai 10 µl d'une solution de GR24 à 30 µM dans l'acétone (1 %), soit une concentration finale en GR24 de 0,3 µM. Les témoins reçoivent 10 µl d'acétone (1 %).

La consommation en oxygène est mesurée en utilisant une électrode à oxygène, dite électrode de Clark (Hansatech Ltd, Hardwick Industrial, Norfolk, Royaume-Uni), insérée dans une chambre en Plexiglas. L'électrode à oxygène est connectée à un enregistreur calibré entre 0 et 100 % avec l'oxygène atmosphérique.

Les spores sont installées dans la chambre et la température est maintenue à 30°C au moyen d'un bain d'eau circulant. Les taux de consommation en oxygène sont lus directement sur l'enregistreur. Les mesures de consommation d'oxygène se font sur 15 minutes, après 4h (série 1) et 5h30 (série 2) de stimulation.

CONSTITUANTS	Concentration finale (mg.l ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	731
KNO ₃	80
KCl	65
KH ₂ PO ₄	4,8
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	288
NaFe-EDTA	8
KI	0,75
MnCl ₂ .4H ₂ O	6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,65
H ₃ BO ₃	1,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,13
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0024
Glycine	3
Thiamine-HCl	0,1
Pyridoxine	0,1
Acide nicotinique	0,5
Myoinositol	50
Milieu complétement en saccharose	10 g.l ⁻¹

Tableau 1

Deux séries d'expérience indépendantes ont été réalisées.

- 5 Pour chacune, les valeurs rapportées correspondent à la moyennes de 3 essais.
Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau 2 ci-après.

L'augmentation de la consommation en oxygène est exprimée en pourcentage par rapport à celle du témoin, traité à l'acétone.

	% de stimulation (moyenne sur 3 essais)
Série 1	29,0
Série 2	76,6

10

Tableau 2

Analyse 2 : Effet de GR7 sur l'activation de la respiration cellulaire de *Gigaspora rosea*.

- 15 Les expériences réalisées à l'oxygraphe dans les mêmes conditions qu'avec GR24 montrent que GR7 est actif sur la respiration de *Gigaspora rosea* à 0,1 µM final, après 5 heures de stimulation.

Le témoin est réalisé avec 10 µl de méthanol/eau (v/v) par ml de milieu.

Deux séries d'expérience indépendantes ont été réalisées, après 4h (série 1) et 5h30 (série 2) de stimulation.

Pour chacune, les valeurs rapportées correspondent à la moyennes de 3 essais. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3 ci-après.

	% de stimulation (moyenne sur 3 essais)
Série 1	24,0
Série 2	33,6

Tableau 3

Analyse 3 : Effet de GR24 sur la stimulation de la ramification des hyphes de *Gigaspora rosea*.

La ramification stimulée des hyphes (apparition de nouveaux apex) est le test couramment employé pour évaluer l'activité stimulatrice de différents effecteurs sur les champignons endomycorhiziens du genre *Gigaspora*. Ce phénomène se produit naturellement à proximité des racines de plantes hôtes, ainsi que sous l'action des exsudats racinaires, et est considéré comme une phase préparatoire à la mise en place de la symbiose (Buée et al., Molecular Plant-Microbe Interaction, 2000, 13:693-698). Cette augmentation de ramification résulte d'une stimulation du métabolisme fongique, et conduit à une augmentation des points de contact entre le champignon et les racines de la plante. Toute augmentation de la ramification des hyphes du champignon augmente la mycorhization.

Des mesures de ramification (exprimées en nombre d'apex apparus après stimulation) des tubes germinatifs de *Gigaspora rosea* ont été réalisées en présence de différentes concentrations de GR24.

Pour ce faire, des spores de *Gigaspora rosea* sont mises à germer dans du milieu M gélosé (milieu M comprenant 0,4 % (p/v) de Phytigel® -SIGMA, France-), pendant 5 jours, à 30°C et dans une atmosphère enrichie à 2 % en CO₂. 10 µl d'agents à tester (en concentration variant de 10⁻⁸ à 10⁻¹⁵ M) en

solution dans du méthanol 50 % sont alors apportés dans le milieu par adjonction dans un puits creusé dans la gélose.

Les témoins reçoivent dans les mêmes conditions, le solvant des molécules à tester (10 µl de méthanol à 50 %).

5 48 heures après le traitement, les apex formés au-dessus de la zone de stimulation sont comptabilisés. Deux séries d'expérience avec GR24, à différentes concentrations, ont été réalisées. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4 ci-après.

Concentration en GR24 (M)	Nombre de spores traitées	Nombre d'apex néoformés	Apex/spore	Facteur de stimulation
Série 1				
Témoin	2	6	3,0	1,0
10 ⁻¹⁵	4	15	3,8	1,3
10 ⁻¹²	4	36	9,0	3,0
10 ⁻¹⁰	3	45	15,0	5,0
10 ⁻⁸	4	65	16,3	5,4
Série 2				
Témoin	2	7	3,5	1,0
10 ⁻¹⁵	2	17	8,5	2,4
10 ⁻¹²	4	34	8,5	2,4
10 ⁻¹⁰	3	40	13,3	3,8
10 ⁻⁸	1	14	14,0	4,0

Tableau 4

Des doses submicromolaires de GR24 conduisent à une stimulation de la ramification d'un facteur 5. Avec des doses inférieures au picomolaire, on observe encore un effet stimulateur manifeste.

Analyse 4 : Effet de GR7 sur la stimulation de la ramification d'hyphe de *Gigaspora rosea*.

Des spores de *Gigaspora rosea* sont mises à germer dans un milieu M gélosé, pendant 5 jours à 30°C et sous une atmosphère enrichie à 2 % en CO₂. 10 µl de solution d'agents à tester sont alors apportés dans le milieu par adjonction dans un puits creusé dans la gélose, à partir d'une solution de concentration variant de 10⁻⁵ à 10⁻¹¹ M en agent à tester. Les témoins reçoivent dans les mêmes conditions, uniquement le solvant des agents à tester (10 µl de méthanol à 50 %).

Les apex formés sont comptabilisés au terme de 48 heures de traitement. Par ailleurs, l'activité d'élongation est évaluée par mesure du nombre de cm formés avant et après traitement. Deux séries d'expérience, à différentes concentrations de GR7, ont été réalisées. Les résultats obtenus sont

5 présentés dans le Tableau 5 ci-après.

Concentration en GR7 (M)	Nombre de spores traitées	Nombre d'apex néoformés	Rapport de stimulation des ramifications	cm néoformés/spore	Rapport de stimulation de la croissance
Série 1					
Témoin	4	1,75		1,1	1,00
10^{-11}	6	5,16	2,94	2,65	2,41
10^{-9}	5	8	4,57	2,62	2,38
10^{-7}	4	8,75	5	4,65	4,23
10^{-5}	6	9,3	5,31	4,88	4,44
Série 2					
Témoin	6	2,16		2,49	1,00
10^{-11}	3	2,66	1,23	2,23	0,89
10^{-9}	6	6,16	2,85	4,99	2,00
10^{-7}	7	10,42	4,82	5,09	2,04
10^{-5}	4	14,25	6,59	6,5	2,60

Tableau 5

On constate que des doses de l'ordre du nanomolaire de GR7 sont significativement actives sur la ramification (nombre d'apex

10 nouvellement formées) et sur l'élongation cellulaire.

Analyse 5 : Effet de GR7 sur la mycorhization de *Medicago truncatula* par *Gigaspora rosea*.

Des mesures du nombre de points de contact établis entre le

15 champignon et les racines lors d'expériences de mycorhization *in vitro* ont été effectuées. Des plantes de *Medicago truncatula* ont été cultivées *in vitro* en présence de spores de *Gigaspora rosea*, sur du milieu M enrichi en GR7.

Pour les essais, du milieu M préparé comme précédemment est enrichi avec du GR7 à 0,1 μ M en concentration finale. Les témoins sont

20 réalisés avec du milieu M dans lequel du méthanol est ajouté à 0,1 % en concentration finale. Le milieu est coulé dans des boîtes de Petri carrées (100x100). Trois boîtes témoins et trois boîtes essais sont préparées. Les spores

de *Gigaspora rosea* sont mises à pré-germer dans ces boîtes (25 par boîte) à l'étuve à 30°C, à 2 % en CO₂, pendant 6 jours. Les graines de *Medicago truncatula* sont stérilisées à l'eau de Javel à 8 degrés chlorimétrique pendant 5 minutes. Après rinçage à l'eau distillée stérile, elles sont mises à germer sur un milieu constitué d'Agar bactériologique de 1 µM de gibbérelline. Après 24 heures à 4°C, elles sont transférées dans une enceinte à 25°C pendant 24 heures. Dix huit plantules ainsi préparées sont alors réparties au hasard dans les six boîtes expérimentales contenant les spores en train de germer. Les boîtes sont disposées verticalement en chambre de culture (22°C, photopériode 16h/8h) pendant 3 semaines. Les plantules sont récoltées et les systèmes racinaires colorés à l'encre selon le protocole de Vierheilig (Vierheilig et al., Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64:5004-5007).

Le nombre de points de contact établis entre le champignon et les racines est comptabilisé plante par plante après observation au microscope.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6 ci-après :

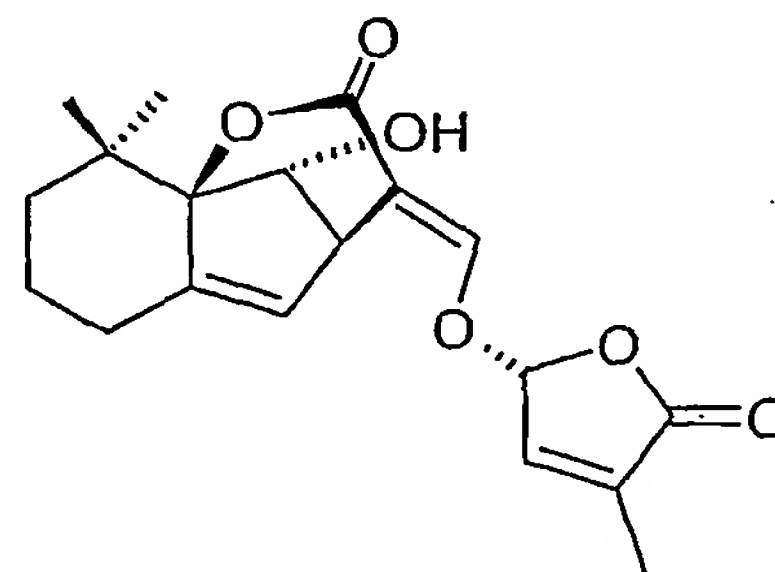
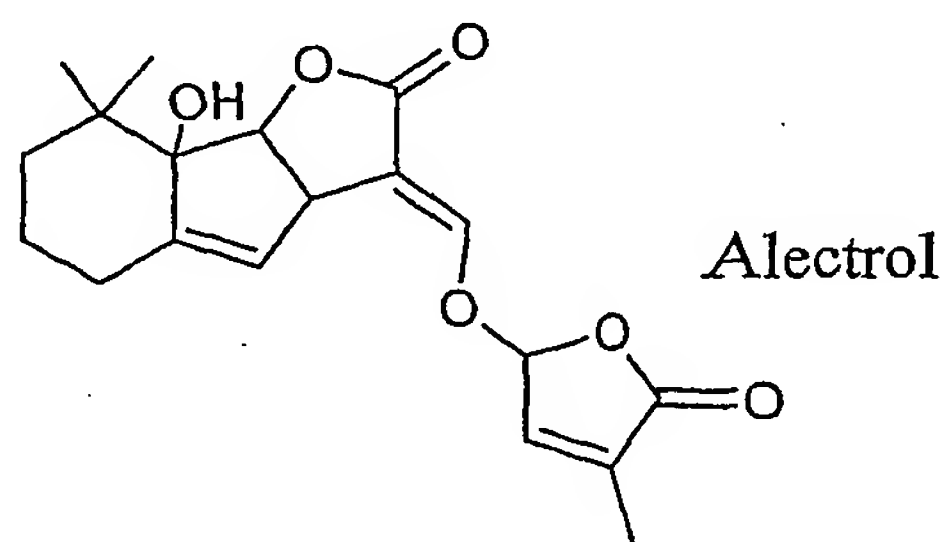
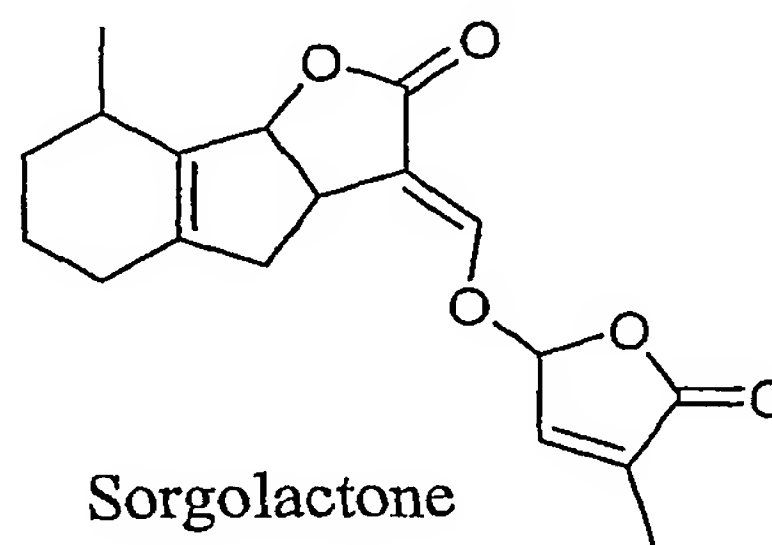
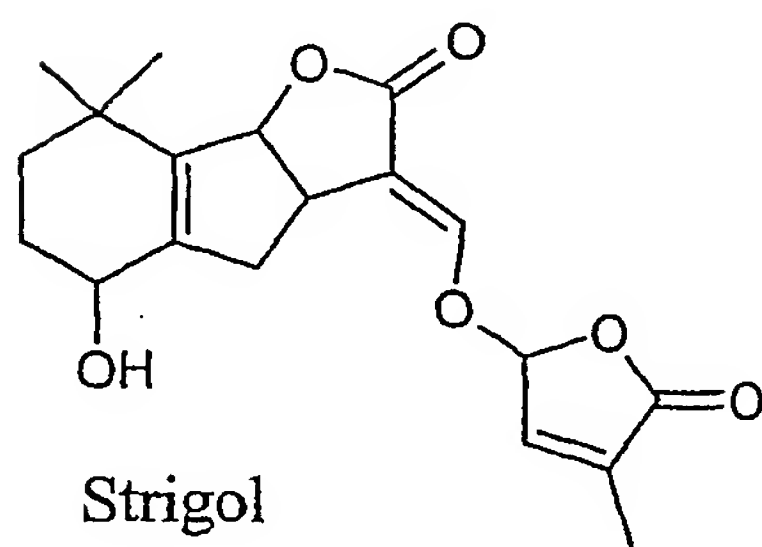
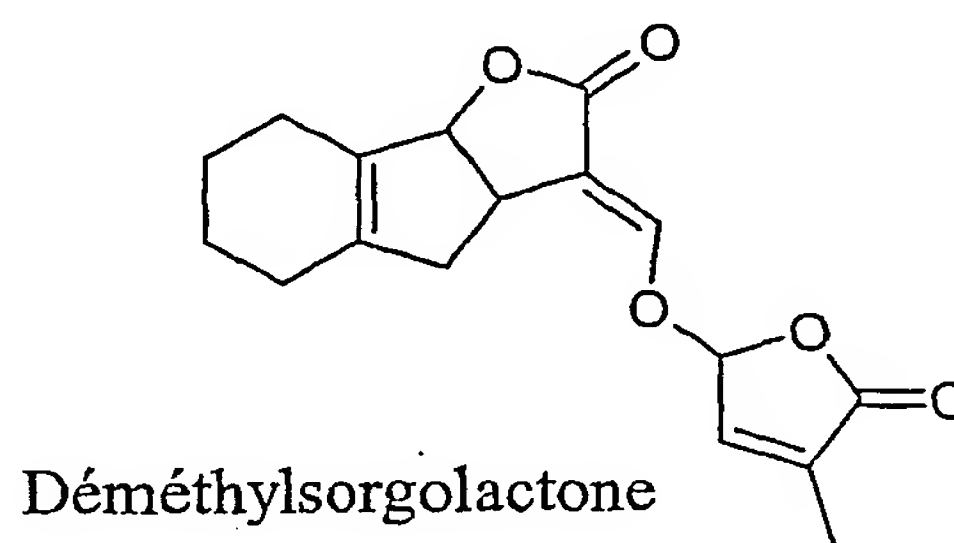
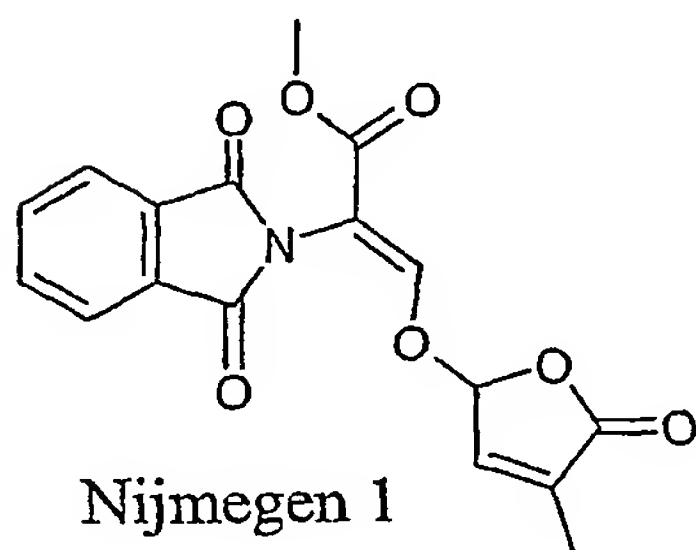
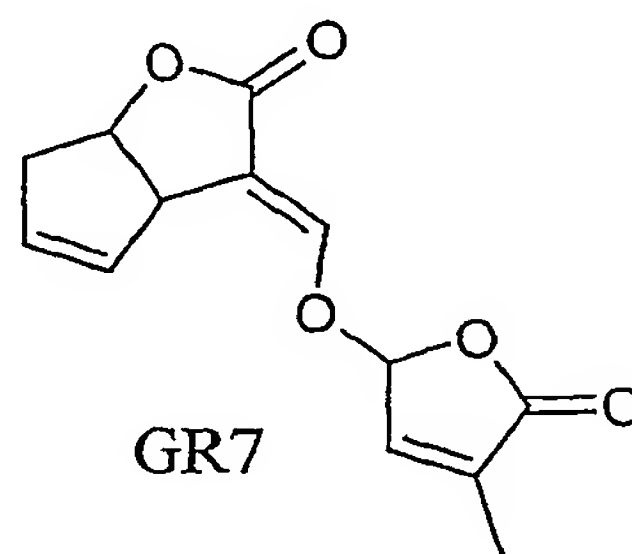
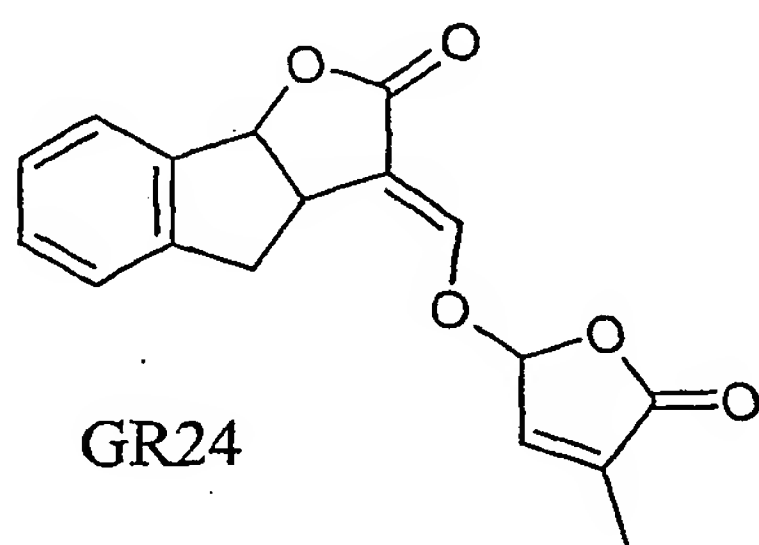
	Nombre de plantes	Moyenne des points de contact	SEM
Témoin (méthanol)	10	2,2	0,8
Essai (GR7)	8	7,75*	2,11

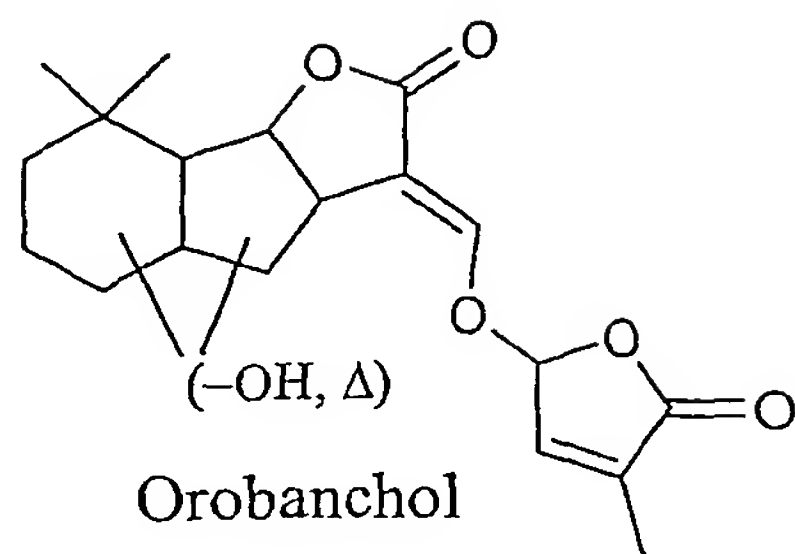
* Moyenne significativement différente (P=0,02, test de Mann-Whitney)

Tableau 6

REVENDICATIONS

- 1/ Procédé de traitement de champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, dans lequel on place au contact des champignons MA, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :





2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on réalise ledit procédé sur des champignons MA sous forme de spores.

3/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on réalise ledit procédé sur des fragments de racines mycorhizées.

4/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement des champignons MA en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA.

5/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement en milieu aseptique *in vitro*.

6/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement sur au moins une plante hôte entière cultivée en pot.

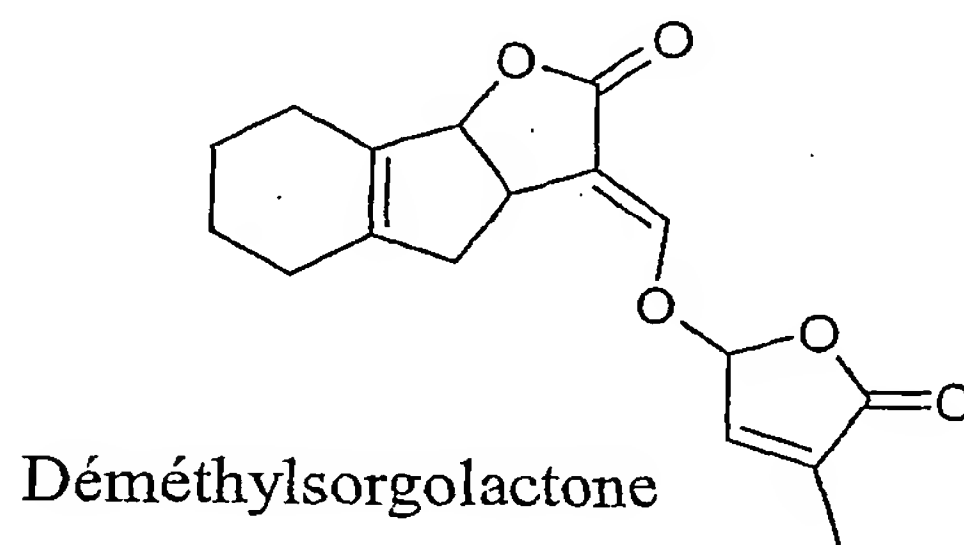
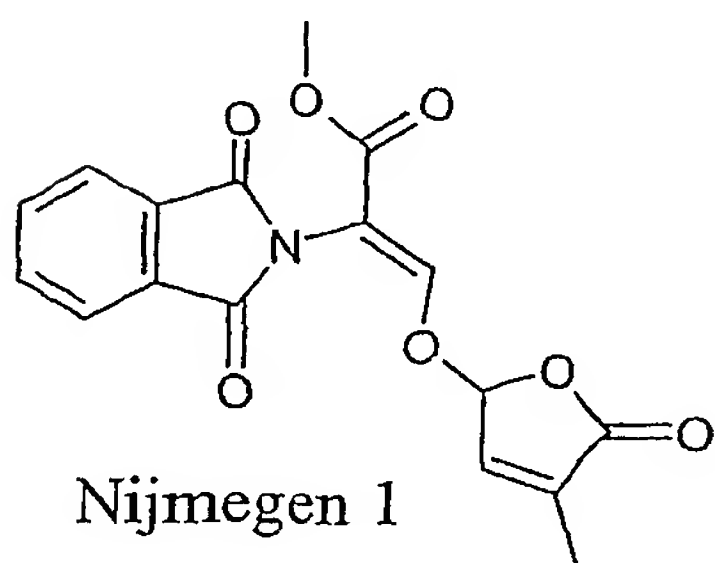
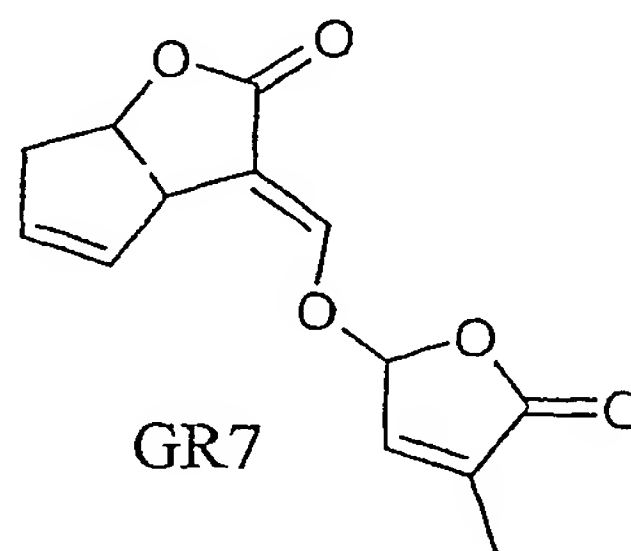
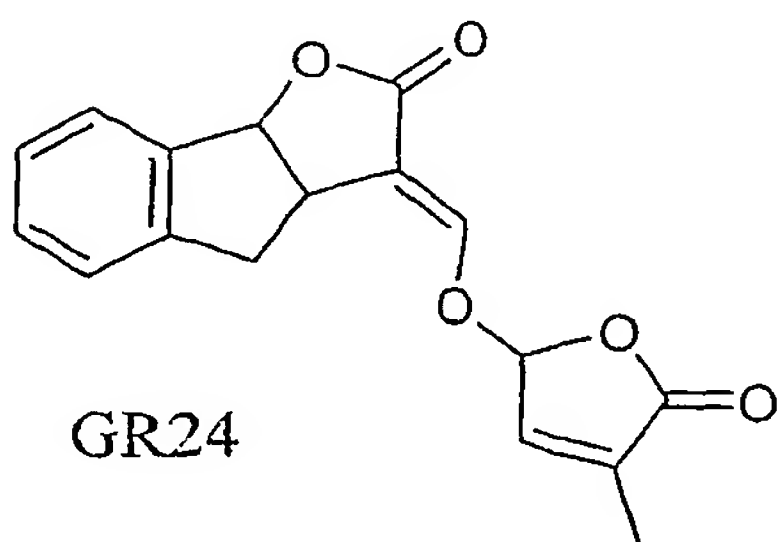
7/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement sur au moins une plante hôte entière cultivée en champ.

8/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on utilise des champignons MA choisis parmi : *Glomus intraradices* et *Gigaspora rosea*.

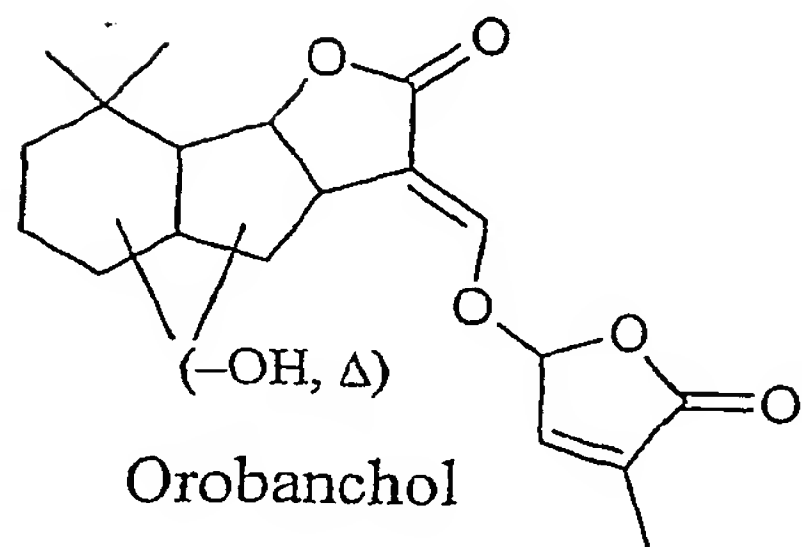
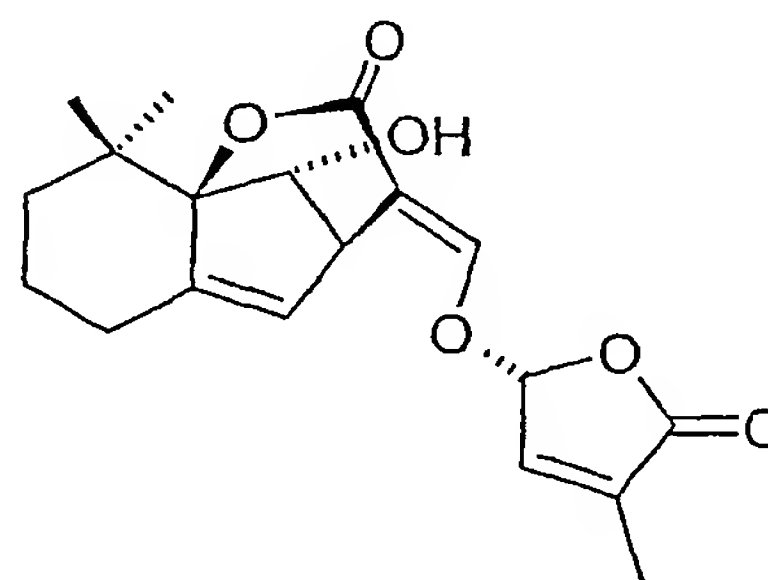
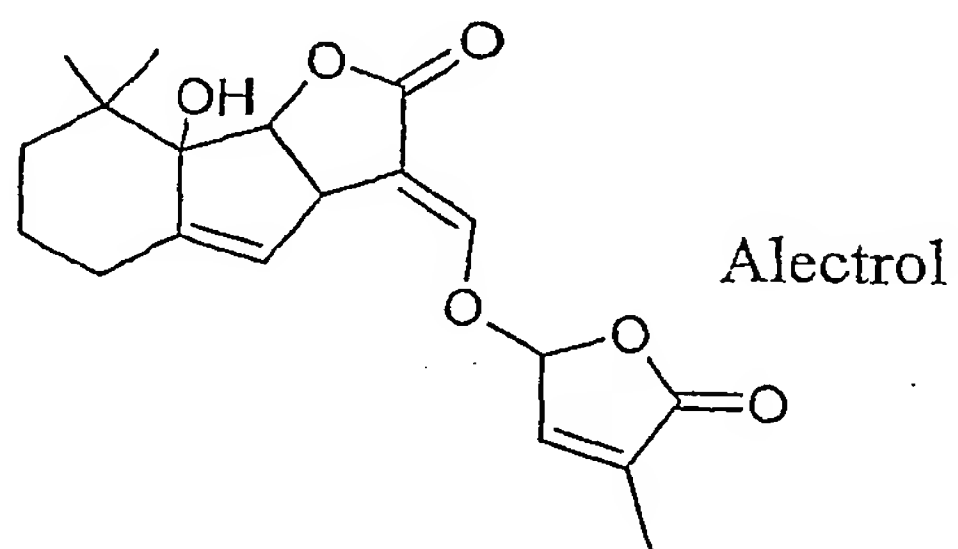
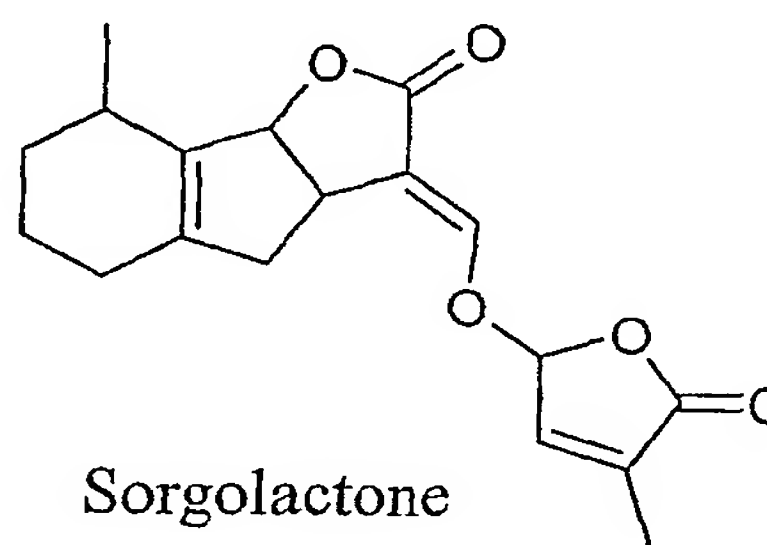
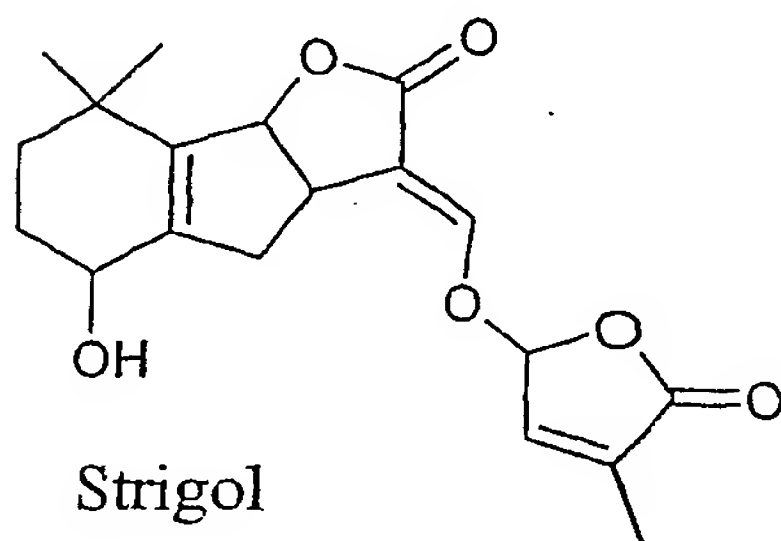
9/ Procédé pour produire de l'inoculum de champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, dans lequel on réalise une co-culture de champignons MA en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA,

caractérisé en ce qu'on place également au contact de ladite co-culture, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :

5

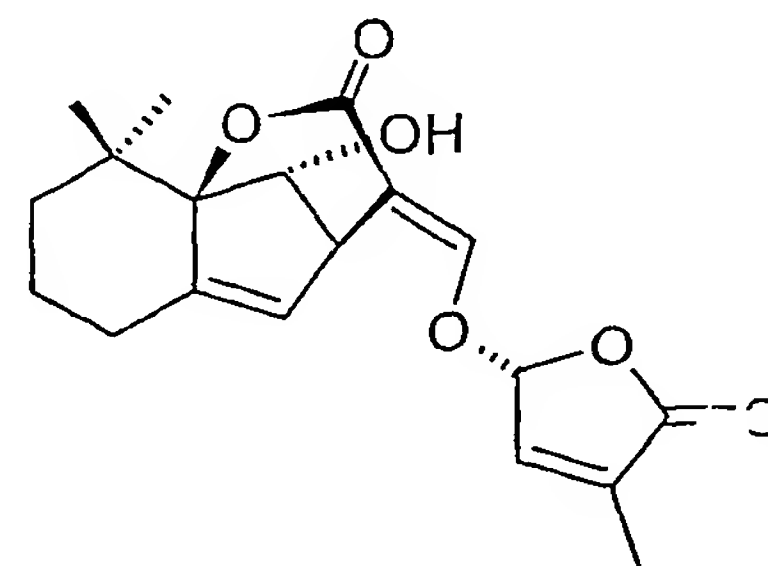
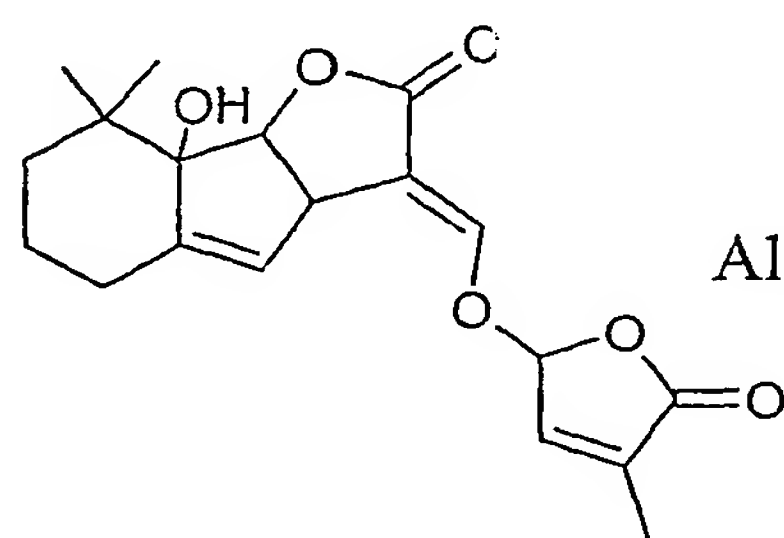
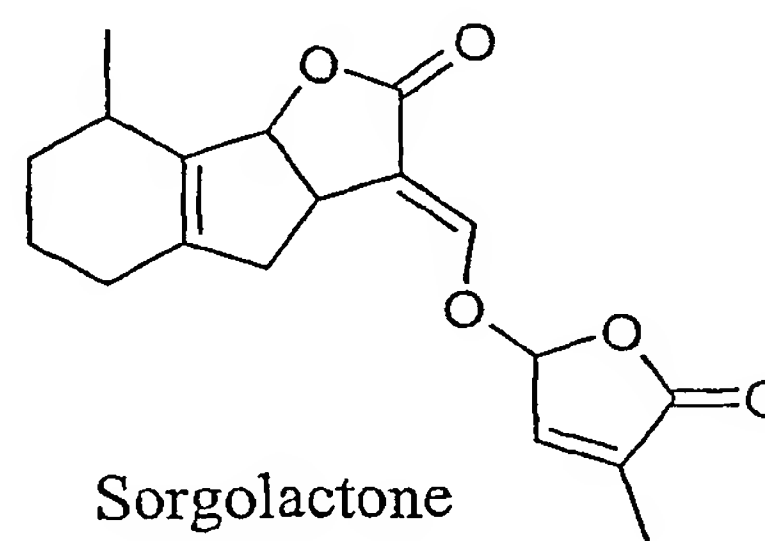
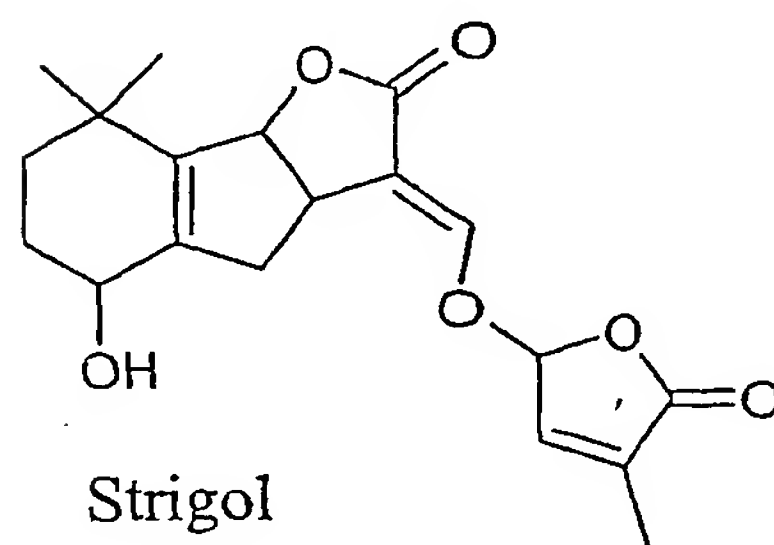
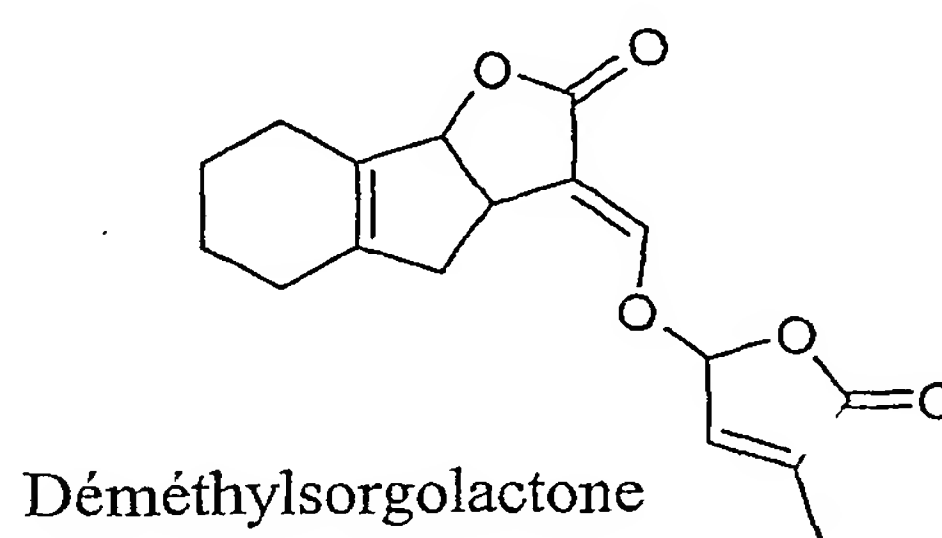
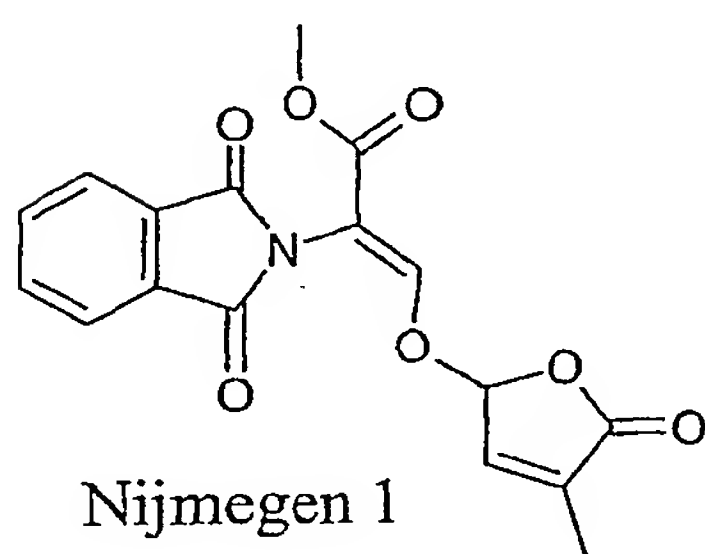
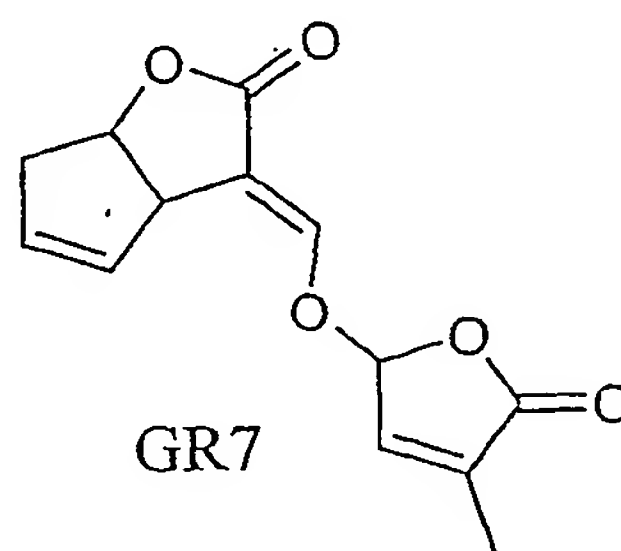
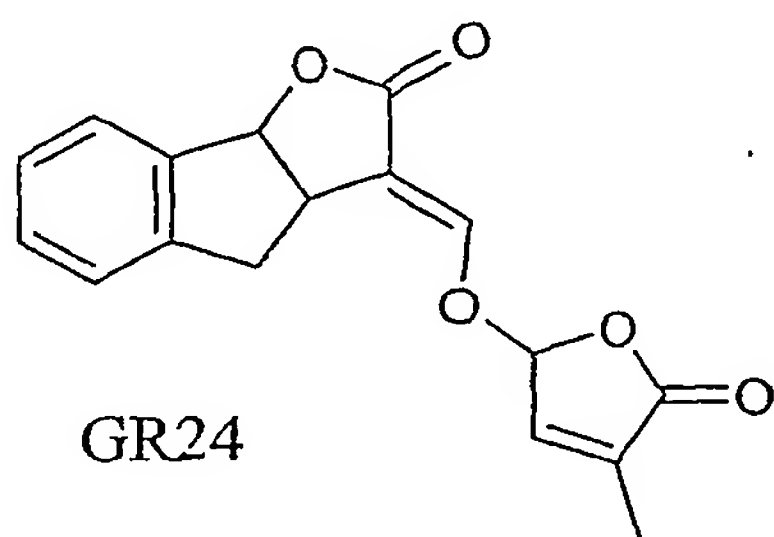


10



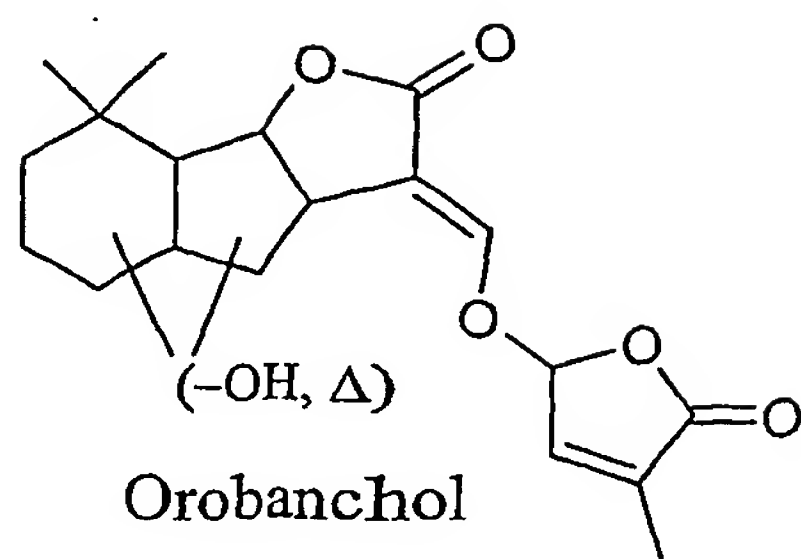
10/ Procédé selon la revendication 9, dans lequel on traite les champignons MA de ladite co-culture par un procédé selon l'une des revendications 1 à 8.

11/ Procédé de culture d'une plante hôte apte à former une symbiose avec des champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, dans lequel on réalise sur un sol de culture un apport d'au moins un agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi :



10

15



caractérisé en ce que ledit apport de l'agent de stimulation est réalisé lors du semis des graines de la plante hôte à cultiver et/ou ultérieurement audit semis.

12/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la plante hôte est cultivée sous serre.

13/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la plante hôte est cultivée en champ.

14/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que lesdits champignons MA sont naturellement présents sur ledit sol de culture.

15/ Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on supplémente ledit sol de culture en champignons MA.

16/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 15, caractérisé en ce qu'on procède à un apport répété d'agents de stimulation du développement et/ou de la croissance desdits champignons MA.

17/ Composition comprenant en combinaison une quantité de semence d'une plante hôte apte à former une symbiose avec des champignons MA, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol.

18/ Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite composition est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant.

19/ Composition selon l'une des revendications 17 ou 18, caractérisée en ce qu'elle comprend également une quantité d'inoculum de champignons MA.

20/ Composition selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'il s'agit d'inoculum de champignons MA choisis parmi : *Glomus intraradices* et *Gigaspora rosea*.

5 21/ Composition comprenant en combinaison, une quantité d'inoculum de champignons MA, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol.

10 22/ Composition selon la revendication 21, caractérisée en ce que ladite composition est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interi	Application No
PCT/FR2005/000284	

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A01N43/12 A01N43/38 A01N63/04 A01G1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A01N A01G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>BECARD G. AND PICHE Y.: "Fungal Growth stimulation by CO₂ and Roots exudates in Vescicular-Arbuscular Mycorrhizial Symbiosis"</p> <p>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 55, no. 9, September 1989 (1989-09), pages 2320-2325, XP009036591</p> <p>cited in the application</p> <p>page 2324, left-hand column, line 31 - line 58</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 October 2005

Date of mailing of the international search report

14/10/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Romano-Götsch, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: Application No
PCT/FR2005/000284

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ELIAS K.S. AND SAFIR, G.R.: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOG, vol. 53, no. 8, August 1987 (1987-08), pages 1928-1933, XP009036589 cited in the application page 1928 page 1930; figure 3; table 1 - Discussion - page 1931 -----	1-22
Y	NEFKENS GERARD H L ET AL: "Synthesis of a phthaloylglycine-derived strigol analogue and its germination stimulatory activity toward seeds of the parasitic weeds Striga hermonthica and Orobanche crenata" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 45, no. 6, 1997, pages 2273-2277, XP002296378 ISSN: 0021-8561 cited in the application page 2273; figure 1 page 2276 -----	1-22
Y	YOKOTA TAKAO ET AL: "Alectrol and orobanchol, germination stimulants for Orobanche minor, from its host red clover" PHYTOCHEMISTRY (OXFORD), vol. 49, no. 7, December 1998 (1998-12), pages 1967-1973, XP002296379 ISSN: 0031-9422 cited in the application page 1967 - page 1967; figure 1 -----	1-22
A	WO 97/28150 A (UNIV MICHIGAN) 7 August 1997 (1997-08-07) page 2, line 8 - line 17 page 2, line 28 - line 40 example 3 -----	1-22
A	WO 91/07868 A (UNIV MICHIGAN) 13 June 1991 (1991-06-13) page 7, line 4 - line 20 page 8, line 15 - line 30 page 11; table 1 -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int: Application No
PCT/FR2005/000284

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9728150	A	07-08-1997	AT 263762 T 15-04-2004
			AU 690873 B2 30-04-1998
			AU 2612497 A 22-08-1997
			CA 2213575 A1 07-08-1997
			DE 69728473 D1 13-05-2004
			DE 69728473 T2 12-08-2004
			EP 0817781 A1 14-01-1998
			ES 2218661 T3 16-11-2004
			JP 3045546 B2 29-05-2000
			JP 11500453 T 12-01-1999
			RU 2134510 C1 20-08-1999
			TW 542697 B 21-07-2003
			US 5691275 A 25-11-1997
W0 9107868	A	13-06-1991	AT 158920 T 15-10-1997
			AU 639058 B2 15-07-1993
			AU 6957891 A 26-06-1991
			BR 9007092 A 24-12-1991
			CA 2045538 A1 05-06-1991
			CN 1052329 A 19-06-1991
			CN 1186599 A 08-07-1998
			DE 69031560 D1 13-11-1997
			DE 69031560 T2 12-02-1998
			DK 456808 T3 20-07-1998
			EP 0456808 A1 21-11-1991
			ES 2042433 T1 16-12-1993
			GR 92300029 T1 26-08-1992
			GR 3025492 T3 27-02-1998
			HU 61430 A2 28-01-1993
			HU 211206 B 28-11-1995
			JP 7063277 B 12-07-1995
			JP 4504209 T 30-07-1992
			US 5002603 A 26-03-1991

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dei - ernationale No
PCT/FR2005/000284

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A01N43/12 A01N43/38 A01N63/04 A01G1/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A01N A01G

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
-------------	--	-------------------------------

Y	<p>BECARD G. AND PICHE Y.: "Fungal Growth stimulation by CO₂ and Roots exudates in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizial Symbiosis"</p> <p>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 55, no. 9, septembre 1989 (1989-09), pages 2320-2325, XP009036591</p> <p>cité dans la demande</p> <p>page 2324, colonne de gauche, ligne 31 - ligne 58</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-22
---	---	------

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 octobre 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/10/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Romano-Götsch, R

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem: ternationale No
PCT/FR2005/000284

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>ELIAS K.S. AND SAFIR,G.R.: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOG, vol. 53, no. 8, août 1987 (1987-08), pages 1928-1933, XP009036589 cité dans la demande page 1928 page 1930; figure 3; tableau 1 - Discussion - page 1931</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-22
Y	<p>NEFKENS GERARD H L ET AL: "Synthesis of a phthaloylglycine-derived strigol analogue and its germination stimulatory activity toward seeds of the parasitic weeds Striga hermonthica and Orobanche crenata" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 45, no. 6, 1997, pages 2273-2277, XP002296378 ISSN: 0021-8561 cité dans la demande page 2273; figure 1 page 2276</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-22
Y	<p>YOKOTA TAKAO ET AL: "Alectrol and orobanchol, germination stimulants for Orobanche minor, from its host red clover" PHYTOCHEMISTRY (OXFORD), vol. 49, no. 7, décembre 1998 (1998-12), pages 1967-1973, XP002296379 ISSN: 0031-9422 cité dans la demande page 1967 - page 1967; figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-22
A	<p>WO 97/28150 A (UNIV MICHIGAN) 7 août 1997 (1997-08-07) page 2, ligne 8 - ligne 17 page 2, ligne 28 - ligne 40 exemple 3</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-22
A	<p>WO 91/07868 A (UNIV MICHIGAN) 13 juin 1991 (1991-06-13) page 7, ligne 4 - ligne 20 page 8, ligne 15 - ligne 30 page 11; tableau 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-22

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den rnative No

PCT/FR2005/000284

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9728150	A	07-08-1997	AT 263762 T	15-04-2004
			AU 690873 B2	30-04-1998
			AU 2612497 A	22-08-1997
			CA 2213575 A1	07-08-1997
			DE 69728473 D1	13-05-2004
			DE 69728473 T2	12-08-2004
			EP 0817781 A1	14-01-1998
			ES 2218661 T3	16-11-2004
			JP 3045546 B2	29-05-2000
			JP 11500453 T	12-01-1999
			RU 2134510 C1	20-08-1999
			TW 542697 B	21-07-2003
			US 5691275 A	25-11-1997
WO 9107868	A	13-06-1991	AT 158920 T	15-10-1997
			AU 639058 B2	15-07-1993
			AU 6957891 A	26-06-1991
			BR 9007092 A	24-12-1991
			CA 2045538 A1	05-06-1991
			CN 1052329 A	19-06-1991
			CN 1186599 A	08-07-1998
			DE 69031560 D1	13-11-1997
			DE 69031560 T2	12-02-1998
			DK 456808 T3	20-07-1998
			EP 0456808 A1	21-11-1991
			ES 2042433 T1	16-12-1993
			GR 92300029 T1	26-08-1992
			GR 3025492 T3	27-02-1998
			HU 61430 A2	28-01-1993
			HU 211206 B	28-11-1995
			JP 7063277 B	12-07-1995
			JP 4504209 T	30-07-1992
			US 5002603 A	26-03-1991

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

